

Please type a plus sign (+) inside this box ☒

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PTO/SB/21 (12-97)

Approved for use through 9/30/00. OMB 0651-0031

Patent and Trademark Office: U.S. Department of Commerce

TRANSMITTAL FORM

(To be used for all correspondence after initial filing)

Application Number	10/149,732
Filing Date	July 11, 2002
First Named Inventor	Oliver KEIL
Group Art Unit	TBA
Examiner Name	TBA
Attorney Docket Number	101195-74

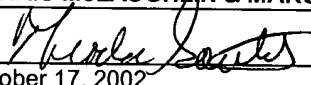
Total Number of Pages in This Submission

ENCLOSURES (check all that apply)

<input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form <input type="checkbox"/> Fee Attached	<input type="checkbox"/> Assignment Papers (for an Application)	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to Group
<input type="checkbox"/> Amendment / Response <input type="checkbox"/> After Final	<input type="checkbox"/> Drawing(s)	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences
<input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s)	<input type="checkbox"/> Licensing-related Papers	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief)
<input type="checkbox"/> Extension of Time Request	<input type="checkbox"/> Petition	<input type="checkbox"/> Proprietary Information
<input type="checkbox"/> Express Abandonment Request	<input type="checkbox"/> To convert a Provisional Application	<input type="checkbox"/> Status Letter
<input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement	<input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address	<input checked="" type="checkbox"/> Additional Enclosure(s) -(please identify below):
<input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s)	<input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer	return receipt postcard
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/ Incomplete Application	<input type="checkbox"/> Small Entity Statement	
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53	<input type="checkbox"/> Request for Refund	

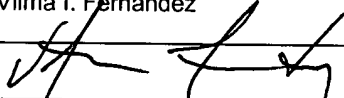
Remarks:

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

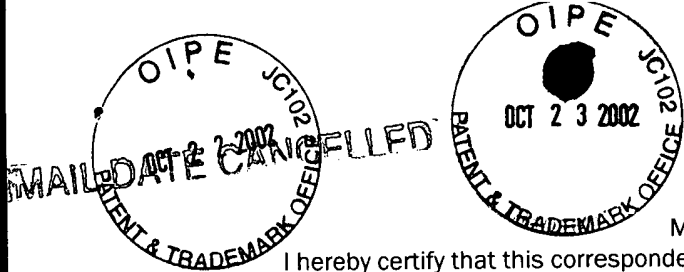
Firm or Individual name	Theodore A. Gottlieb NORRIS McLAUGHLIN & MARCUS, P.A.	
Signature		Reg. No. 42,597
Date	October 17, 2002	

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to : Hon. Assistant Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231.

Typed or printed name	Vilma I. Fernandez	
Signature		Date October 17, 2002

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Hon. Commissioner of Patents, Washington, DC 20231.



Atty's Docket No: 101195-74

MAILING CERTIFICATION

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231 on October 17, 2002


Theodore A. Gottlieb

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Examiner : TBA
Group Art Unit : TBA
Applicant : Oliver KEIL
Appln. No. : 10/149,732
Filed : July 11, 2002
For : AMPHIPHILIC POLYAMINES, THE USE AND METHOD FOR SYNTHESIS THEREOF

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Hon. Assistant Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231


Dear Sir:

In support of the claim of priority made by the applicant at the time of filing, transmitted herewith is a Certified Copy of the following application:

German Patent Application No. 199 60 924.1.

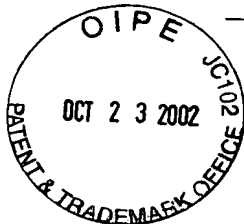
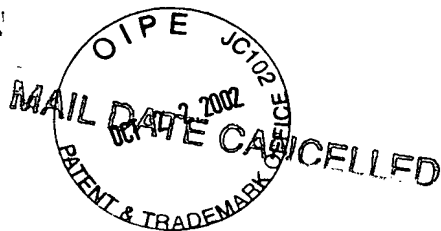
It is respectfully requested that receipt of the Certified Copy be acknowledged promptly to the undersigned.

Respectfully submitted,


Theodore A. Gottlieb
Attorney for Applicant
Norris, McLaughlin & Marcus P.A.
220 East 42nd Street, 30th Floor
New York, N.Y. 10017
Telephone: (212)808-0700
Telecopier: (212)808-0844

OCT 25 2002
RECEIVED
MAIL ROOM

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



TO 1700 MAIL ROOM

OCT 25 2002

RECEIVED

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

199 60 924.1

Anmeldetag:

17. Dezember 1999

Anmelder/Inhaber:

G.O.T. Therapeutics GmbH, Berlin/DE

Erstanmelder: Dr. Oliver K e i l , Wuppertal/DE

Bezeichnung:

Amphiphile Polyamine, deren Anwendungen
und Verfahren zu ihrer Synthese

IPC:

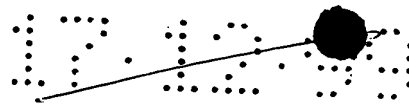
C 07 D, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. September 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky

Zusammenfassung



3

Die vorliegende Erfindung betrifft amphiphile Polyamine und deren Salze, welche befähigt sind, Biopolymere wie DNA, RNA, Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme, Proteine und Peptide zu komplexieren und in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Hierbei erwiesen sich Polyaminochinolin-Derivate, welche mit lipophilen Gruppen modifiziert sind, als besonders geeignete Substanzklasse. Aufgrund ihrer Eigenschaft mit biologisch aktiven Molekülen, wie zum Beispiel DNA oder RNA, Aggregate zu bilden, eignen sich diese Verbindungen insbesondere für Anwendungen in der Gentherapie, aber auch für diagnostische Zwecke.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft amphiphile Polyamine und deren Salze, die in der Lage sind biologisch aktive Makromoleküle (insbesondere DNA und RNA) in eukaryotische Zellen einzuschleusen.

In den letzten 10 Jahren hat sich der Transfer von Biopolymeren, insbesondere von DNA, RNA und Oligonukleotiden, in eukaryotische Zellen zu einem fundamentalen Arbeitsgebiet in der Molekularbiologie und der molekularen Medizin entwickelt [P.A. Martin, S.M. Thomas; Human Gene Therapy 9 (1998) 87-114]. Hierbei sind vor allem gentherapeutische Ansätze, aber auch diagnostische Methoden von besonderem Interesse. Heute bereits teilweise etablierte Verfahren zur Einbringung von DNA in eukaryotische Zellen beruhen darauf, die betreffende DNA-Sequenz mit Hilfe von replikationsdefizienten, rekombinanten Retro-, Adeno- oder adenoassoziierten Viren einzuschleusen. Diese haben jedoch den Nachteil, daß sie bislang nahezu ausschließlich auf *ex vivo* Anwendungen beschränkt sind, da die viralen Proteine mitunter zu heftigen Immunreaktionen führen und replikationskompetente Viren nicht immer ausgeschlossen werden können. Retroviren weisen zudem den Nachteil auf, daß sie unspezifisch stabil in das Wirtsgenom integrieren und somit potentiell maligne Mutationen auslösen können. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es verständlich, daß diese Verfahren extrem hohe Sicherheitsanforderungen stellen und sich nur mit großem finanziellen Aufwand ausführen lassen. Biophysikalische Methoden wie zum Beispiel der Beschuß von Zellen mit DNA-beladenen Goldpartikeln („Biolistik“) oder die Elektroporation sind aus offensichtlichen Gründen ebenfalls nur *ex vivo* anwendbar. Die seit langem bekannte Calciumphosphat-Copräzipitation und die DEAE-Dextran Methode erscheinen wegen ihrer geringen Effizienz als wenig geeignet.

Eine weiteres in den letzten Jahren entwickeltes Verfahren zur Einschleusung von biologisch aktiven Makromolekülen in eukaryotische Zellen verwendet kationische Polymere wie Poly-L-lysin, Polyethylenimin oder PAMAM-Dendrimere. Polyanionen wie DNA, RNA oder Oligonukleotide bilden mit diesen über elektrostatische Wechselwirkungen Aggregate und werden in dieser Form von den Zellen vermutlich über Endocytose aufgenommen.

Poly-L-lysin muß jedoch zuvor durch chemische Reaktion mit Rezeptorliganden (z.B. Transferrin, Glycoproteine) [E. Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 3410-3414] oder endosomolytischen Peptiden [E. Wagner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 7934-7938] modifiziert werden um eine hinreichende Effizienz aufzuweisen.

Deshalb und aufgrund ihres polymeren Charakters sind Verbindungen dieses Typs sehr heterogen zusammengesetzte Substanzgemische und lassen sich daher nur mit großem Aufwand in definierter Form produzieren.

Ein weiteres Verfahren, welches in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat, basiert auf den grundlegenden Arbeiten von Felgner et al.. Dabei werden aus kationischen, lipidischen Amphiphilen, pur oder in Mischung mit neutralen Phospholipiden wie Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), liposomale oder auch micellare Strukturen generiert. Diese bilden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit anionischen Biopolymeren (wie DNA oder RNA) Aggregate, welche daraufhin effizient von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden. DNA kann so in den Zellkern transportiert werden und führt dann zur Expression des entsprechenden Proteins. Obgleich der Mechanismus hierfür bislang noch nicht aufgeklärt ist, herrscht doch inzwischen Einigkeit darüber, daß die Aggregate durch endocytotische Prozesse über Endosomen in das Zellinnere gelangen. Auch ist bekannt, daß der pH-Wert innerhalb der Endosomen, bedingt durch sog. vacuoläre H⁺-ATPasen, im zeitlichen Verlauf auf ca. pH 5-6 absinkt. Es gibt Hinweise darauf, daß diese Erhöhung der Protonenkonzentration für die anschließende Verschmelzung der Endosomen mit Lysosomen verantwortlich ist [A.K. Fok et al., Eur. J. Cell Biol. 43(3) (1987) 412-420]. Damit die internalisierten Biopolymere in andere Zellkompartimente, (z.B. Cytoplasma oder Zellkern) gelangen können, müssen sie aus den Endosomen ausbrechen, da sie anderweitig in den Lysosomen enzymatisch abgebaut werden. Dieses wird in den meisten Fällen durch die Zumischung des Phospholipids DOPE erreicht, welches aufgrund seiner konischen Form in der Lage ist, invertierte hexagonale flüssigkristalline Phasen zu induzieren [J.O. Rädler et al., Science 281 (1998) 78-81]. Diese weisen eine hohe Tendenz zur Verschmelzung mit Doppelschichtstrukturen (z.B. biologische Membranen) auf. Aus den oben genannten Gründen ist es auch von entscheidender Bedeutung, die endosomale Acidifizierung zu verhindern, um ein Verschmelzen der Endosomen mit den Lysosomen hinauszuzögern. Dieser Sachverhalt wird auch dadurch bestätigt, daß ein 10-100 µM Zusatz von Chloroquin - einer schwachen Base - im Zellkulturmedium die Effizienz der kationischen Amphiphile signifikant steigert [P.L. Felgner et al., J. Biol. Chem. 269(4) (1994) 2550-2561; A.K. Tanswell et al. Am. J. Physiol. 275 (3 Pt 1) (1998) L452-L460].

Die Zugabe von schwachen, puffernden Basen sorgt auch dafür, daß die Aktivität der lysosomalen, abbauenden Enzyme, welche ein pH-Optimum im sauren pH-Bereich aufweisen, stark herabgesetzt wird. Nachteiligerweise läßt sich dieser Effekt jedoch nicht *in vivo* anwenden.

- 5 Seit der erstmaligen Beschreibung durch Felgner ist eine Vielzahl, zumeist empirisch gefundener, kationischer Amphiphile für den Transfer von anionischen Makromolekülen wie z.B. DNA synthetisiert worden [A.D. Miller, Angew. Chem. **110** (1998) 1862-1880; L. Huang, X. Gao; Gene Therapy **2** (1995) 710-722]. Viele dieser kationischen Lipide, wie z.B. DOTMA oder DLRIE, haben den Nachteil, daß sie nur schwer metabolisierbar sind und
- 10 daher deutliche zelltoxische Eigenschaften aufzeigen. Mit Ausnahme der Lipopolyaminderivate (Lipospermine u.a.) [Blagbrough et al., Chem. Commun. **13** (1998) 1403-1404] weisen die bislang bekannten kationischen Amphiphile keine Funktionalitäten auf, die bei einem physiologischen pH-Wert (ca. pH 7.4) eine hinreichende Pufferkapazität besitzen, um die Acidifizierung der endocytotischen Vesikel zu verhindern. Nachteilig bei der
- 15 Herstellung der Lipopolyamin-Verbindungen ist, daß es sich um multifunktionelle Moleküle handelt, bei denen sich die Funktionalitäten kaum in ihrer chemischen Reaktivität unterscheiden. Sie müssen daher unter Verwendung orthogonaler Schutzgruppenstrategien aufwendig in vielstufigen Verfahren synthetisiert werden.

Außerdem wird die Aktivität vieler bislang bekannter kationischer Lipide durch die

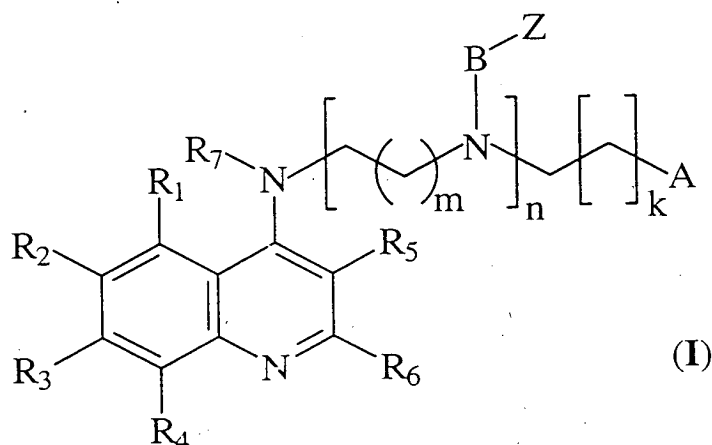
20 Anwesenheit schon geringer Anteile (>5%) an Serum im umgebenden Medium inhibiert.

Der Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, neue amphiphile Polyamine für den Transfer von Biopolymeren (insbesondere von DNA und RNA) in eukaryotische Zellen zur Verfügung zu stellen, die

- 25 • leicht metabolisierbar sind und eine geringe Zelltoxizität aufweisen,
- die auch in Gegenwart hoher Serumanteile eine hohe Transfer-Effizienz zeigen,
 - die leicht und kostengünstig in großen Mengen produziert werden koennen
 - und die in einem Molekül sowohl Funktionalitäten für eine effiziente Komplexierung anionischer Makromoleküle als auch solche, die bei physiologischen pH-Werten eine sehr
- 30 gute Pufferkapazität aufweisen, vereinen.

Ein im Hinblick auf die genannten Anforderungen überraschend effizienter Transfer von Biomolekülen, insbesondere von DNA und RNA, in eukaryotische Zellen (Transfektion) läßt sich erreichen, durch die erfindungsgemäßen amphiphilen Polyamine der allgemeinen Formel I,

5



wobei

R_1 bis R_6 unabhängig voneinander einen Rest Wasserstoff, Halogen, $-C\equiv N$, $-NO_2$, $-SO_3H$,
 10 $-COOH$, $-N(Alkyl)_2$, $-NH(Alkyl)$, $-NH_2$, $-Alkyl$, $-OH$, $-O-Alkyl$, $-O-Aryl$, $-O-Hetaryl$,
 $-O(C=O)Alkyl$, $-(C=O)Alkyl$, $-SH$, $-S-Alkyl$ bedeuten,

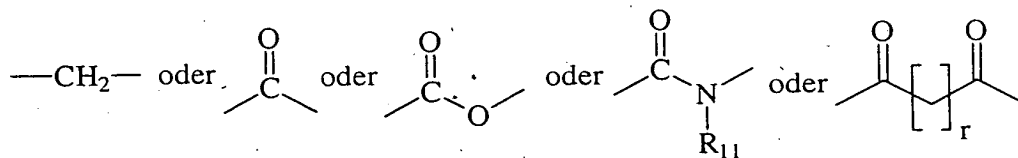
R_7 einen Rest Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen bedeutet,

m und k unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 1 bis 6 sind,

n eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist,

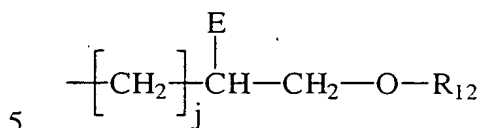
15 A eine Gruppe $N^+R_8R_9R_{10}Y^-$ bedeutet, wobei R_8 bis R_{10} unabhängig voneinander einen Rest Wasserstoff, eine Alkyl-Gruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine Gruppe $-(CH_2)_i-OH$ oder eine Gruppe $-(CH_2)_i-NH_2$ mit $i=2-6$ bedeuten und Y^- ein pharmazeutisch akzeptables Anion darstellt,

B eine Gruppe



bedeutet, in der R_{11} die für R_7 angegebene Bedeutung hat und r eine ganze Zahl von 1 bis 6 sein kann,

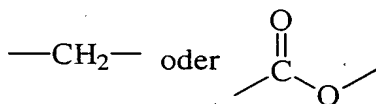
Z ein über das C-Atom 3 (des Steran-Grundgerüsts) gebundenes Steroid, einen Rest R_{12} oder eine Gruppe



bedeutet, wobei j eine ganze Zahl von 0 bis 4 sein kann, R_{12} einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl oder Acylrest mit 8 bis 24 C-Atomen darstellt und E eine Gruppe $\text{O}-\text{R}_{13}$ oder $\text{CH}_2\text{O}-\text{R}_{13}$ bedeutet, bei der R_{13} die für R_{12} angegebene Bedeutung hat und gleich oder von R_{12} verschieden sein kann,

10 und wobei das Stickstoff-Atom des Chinolin-Gerüsts zusätzlich von einer Säure H^+Y^- protoniert sein kann, wobei Y^- ein pharmazeutisch akzeptables Anion darstellt.

Bevorzugt sind dabei solche Verbindungen in denen R_1 , R_2 , R_4 , R_6 und R_7 ein Wasserstoffatom darstellen, R_5 Wasserstoff oder ein Alkylrest ist und R_3 ein Halogenatom, 15 insbesondere Chlor, bedeutet. Weiterhin sind solche Verbindungen von Vorteil, in denen m und k gleich 1 bis 3 sind, n gleich eins ist und A eine Dimethylammonium- oder Diethylammonium-Gruppe bedeutet. Darüber hinaus sind Verbindungen bevorzugt, bei denen B eine Gruppe



repräsentiert und Z ein membranassoziiertes Steroid oder 20 einen 1,2-diglyceridartigen Rest darstellt. Ganz besonders bevorzugt sind solche Moleküle, bei denen Z einen Cholesterylrest oder einen 1,2-Dioleoyloxyethylrest bezeichnet und in denen das pharmazeutisch akzeptable Anion Y^- gleich Halogenid, Acetat oder Phosphat ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Lipide in Mischung mit anderen, dem Fachmann schon bekannten Lipiden, wie Phospholipiden, insbesondere 25 DOPE oder mit membranassoziierten Steroiden, insbesondere Cholesterol zur Einschleusung von biologisch aktiven Biomolekülen, insbesondere von DNA und RNA angewendet. Dabei können die Lipide in wässriger (liposomaler) Dispersion oder als Lösung in mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln vorliegen, und die DNA (RNA) kann mit Polykationen, insbesondere mit Protaminsulfat vorkomplexiert sein.

Gegenüber den bislang bekannten Transfektionsreagenzien weisen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine Reihe entscheidender Vorteile auf. Moleküle der beschriebenen Art besitzen in der hydrophilen Kopfgruppe gleichzeitig mindestens zwei basische Funktionalitäten mit deutlich unterschiedlichen pK_s -Werten, welche durch das nicht lipophil modifizierte, aliphatisch-gebundene Stickstoffatom und durch das aromatisch-gebundene Stickstoffatom (Chinolinring) gebildet werden. Die pK_s -Werte der entsprechenden Gruppierungen betragen etwa $pK_s=10.2$ (für Diethylamino) bzw. $pK_s=8.06$ (Chinolin). Erstere Funktionalität ist somit bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 nahezu vollständig protoniert und bildet daher starke elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Biomolekülen aus. In den Fällen, in denen die aliphatische Stickstoffgruppe quaternisiert ist, ist die positive Ladung nahezu unabhängig vom pH-Wert des Milieus. Die Chinolin-Base ist dagegen bei einem pH-Wert von 7,4 zu ca. 20% deprotoniert und daher sehr gut geeignet, den sinkenden pH-Wert nach Aufnahme in die Endosomen zu puffern. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist, daß manche Chinolin-Basen in der Lage sind, vakuoläre (H^+)-ATPasen zu inhibieren. Die der Erfindung zugrunde liegenden Verbindungen können zusätzlich auch hierdurch die Acidifizierung der Endosomen und somit den Transport der Aggregate in die Lysosomen und deren Abbau verhindern. Aufgrund des aromatischen Charakters des Chinolingerüsts sind außerdem π -Elektronen-Wechselwirkungen mit den Nucleotidbasen der DNA oder RNA möglich-ein zusätzlicher Vorteil gegenüber den bislang bekannten Reagenzien in Hinsicht auf die Komplexbildung.

Die bisher verwendeten Transfektionsreagenzien weisen keine starken Chromophore auf und sind daher bei HPLC-basierten Analysen- und Reinigungsverfahren mittels UV-Detektion nur sehr schwer detektierbar. Aufgrund der starken UV-Absorption des Chinolingerüsts im Wellenlängenbereich von 200-300nm sind die erfindungsgemäßen Verbindungen leicht detektierbar und bieten somit auch bei der Analytik und der arzneimittelgerechten Präparation entscheidende Vorteile.

Die Herstellung der Verbindungen erfolgt in wenigen Stufen aus preiswerten Ausgangschemikalien unter Anwendung der dem Fachmann geläufigen Methoden [Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl) 4. Aufl. Thieme Verlag (Stuttgart) 1952; The Chemistry of Heterocyclic Compounds, John-Wiley & Sons, Inc, Vol.32 part I (1977)]. Die entsprechenden Reaktionsschemata sind in den Abb. 1-4 dargestellt.

- Die Transfektions- und zelltoxischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Lipide wurde auf verschiedenen Tumorzelllinien getestet und mit denen bislang bekannter Reagenzien verglichen (Abb. 5 und 6): Als Reportersysteme dienten GFP bzw. β -Galactosidase codierende Plasmide. Bei den Untersuchungen wurden die Lipide #2, #7, #9 mit dem
- 5 Phospholipid 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) gemischt. Wäßrige liposomale Formulierungen wie auch ethanolische Lösungen der Lipide erwiesen sich dabei gleichermaßen für die Transfektionen als geeignet. Mit den Lipiden #2, #7 und #9 ist es möglich, alle untersuchten Zelllinien mit höherer Effizienz zu transfizieren als mit den bekannten Lipiden Transfectam®, LipofectamineTM und DC-Chol. Überraschend günstig sind
- 10 auch die zelltoxischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Lipide (Abb. 7) und die Unempfindlichkeit der Reagenzien gegenüber hohen Serumanteilen im Zellkulturmedium (Abb. 8). Selbst in Gegenwart von 50% fetalem Kälberserum verbleibt noch über 50% der Gentransfereffizienz, die sich unter Standardbedingungen (10% FCS) erzielen läßt.
- Die Transfektionseffizienz der Lipide #2 und #7 (Mischung mit 70mol% DOPE) in
- 15 ethanolischer Lösung ist in Abbildung 9 dargestellt. Auch mit diesen Reagenzien läßt sich beispielsweise die Mamma-Tumorzelllinie MCF7 deutlich effizienter mit dem pEGFP-N1-Plasmid transfizieren als mit dem bekannten Reagenz Transfectam. Die Komplexierung der DNA mit dem polykationischen Protein Protaminsulfat führt zwar nicht zu einer signifikanten Steigerung des Anteils an transfizierten Zellen. Überraschenderweise wird jedoch eine
- 20 deutliche stärkere Expression des Reportergens ermöglicht. Der Median der Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen liegt bei Verwendung der mit Protaminsulfat vorkomplexierten DNA um mehr als 50% höher als bei der Verwendung der nicht vorkomplexierten DNA (Abb. 9).
- 25 Die Erfindung soll exemplarisch anhand der nachfolgenden Beispiele erläutert sein. Obwohl die Beispiele bevorzugte Ausführungsformen repräsentieren, soll der Umfang der Erfindung durch sie nicht eingeschränkt werden.

Beispiel 1

Synthese von 7-Chlor-4-[*N*¹-(*N*⁴-*H*)-(*N*⁷-diethyl)-1,4,7-triaza-heptyl]-chinolin (#1)

- 5 In einem verschlossenen 25 ml Rundkolben werden 1.39 g (7 mmol) 4,7-Dichlorchinolin und 1.32 g (14 mmol) Phenol in einer Argonschutzgasatmosphäre unter Rühren für eine Stunde auf 120°C erhitzt. Die Schmelze wird daraufhin auf ca. 60°C abgekühlt, mit 1.115 g (7 mmol) Diethylaminoethylethylendiamin versetzt und für 24 Stunden unter Rühren auf 125°C erhitzt, wobei sie sich rötlich-dunkelbraun verfärbt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur
- 10 wird der Rückstand in 30 ml 2N Essigsäure gelöst und mit konz. Essigsäure auf pH 4-5 angesäuert. Die Lösung wird 4 x mit je 25 ml CHCl₃ extrahiert und die wäßrige Phase anschließend mit konz. wäßrigem Ammoniak auf pH 8-9 eingestellt (ca. 7-8 ml). Die trübe Lösung wird daraufhin 4 x mit je 25 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden noch ein mal mit 10 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄
- 15 getrocknet und das Lösungsmittel dann am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum erhält man 1.94 g (6.1 mmol) = 87% d. Th. eines bräunlichen, zähen Öls, welches über Nacht kristallin erstarrt. Die Verbindung kann ohne weitere Aufreinigung zur Darstellung von #2 verwendet werden. Analytisch reine Substanz wird durch präparative Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 (70-230 mesh) erhalten (Eluent: Stufengradient aus
- 20 CH₂Cl₂/MeOH 3:1 (0.1% Triethylamin) auf CH₂Cl₂/MeOH 1:3 (0.1% Triethylamin)).

DC (Kieselgel 60) [CHCl₃/MeOH 4:1]; R_f=0.04; UV-Detektion

25

Beispiel 2

Synthese von 7-Chlor-4-[*N*¹-(*N*⁴-carboxycholesteryl)-(*N*⁷-diethyl)-1,4,7-triaza-heptyl]-chinolin hydrochlorid (#2)

- 30 In einem 50 ml Rundkolben mit seitlichem Gaseinlaß werden unter einer Argonatmosphäre 614 mg (1.91 mmol) #1 in 15ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Daraufhin wird bei Raumtemperatur eine Lösung von 853 mg (1.90 mmol) Cholesterylchlorformiat in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan innerhalb von 15 min unter Rühren zugetropft.

Nach einer Reaktionszeit von 2 h wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand für weitere 2 h im Vakuum getrocknet. Man erhält 1.45 g eines gelbbraunen amorphen Feststoffs. Weitere säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel 60 (70-230 mesh)(Eluent $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:1) liefert die reine Verbindung als einen
5 farblosen, amorphen Feststoff.

DC (Kieselgel 60) [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1]; $R_f=0.24$; UV-Detektion und Detektion mit Vanilin/konz. Schwefelsäure

10

Beispiel 3

Synthese von 7-Chlor-4-[N^1 -(N^4 -carboxycholesteryl)-(N^7 -diethyl-hydroxyethyl)-1,4,7-triazaheptyl]-chinolin hydrobromid (#3)

15

In einem verschlossenen 10 ml Rundkolben werden unter einer Argonatmosphäre 40 mg (52 μmol) in 500 μl wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und mit 30 mg trockenem Natriumcarbonat sowie mit 300 μl 2-Bromethanol versetzt. Die Mischung wird unter Rühren 16 Stunden bei 65°C erwärmt, danach mit 10 ml Dichlormethan versetzt und filtriert. Die
20 flüchtigen Bestandteile werden daraufhin bei 60°C im Hochvakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung auf Kieselgel 60 (70-230 mesh) mit Dichlormethan/Methanol 5:1 als Eluent erhält man 25 mg (29.1 μmol)= 56% d.Th. eines farblosen, glasartigen Feststoffs.

25 DC (Kieselgel 60) [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1]; $R_f=0.25$; UV-Detektion und Detektion mit Vanilin/konz. Schwefelsäure

10
Beispiel 4

Synthese von *N,N*-Dimethyl-*N'*-cyanoethyl-ethylendiamin (#4)

- 5 In einem 500 ml Rundkolben werden 10.9 ml (100 mmol) 2-Dimethylaminoethylamin, gelöst in 150 ml 2-Propanol, vorgelegt. Daraufhin werden unter Kühlung im Eisbad 6.91 ml (105 mmol) Acrylonitril zugefügt und die Mischung für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das Lösungsmittel im Vakuum (7 mbar) bei 40-50°C entfernt und der Rückstand anschließend im Vakuum destilliert. Man erhält 9.80 g (69 mmol) = 69% d.Th.
- 10 einer farblosen Flüssigkeit mit einem Sdp. von 135°C (7mbar).

IR (Film. [cm⁻¹]):

$\bar{\nu}$ = 3500-3150 (m,b) [v N-H]; 2930 (s), 2840 (s), 2810 (s), 2750 (s) [v_{as,s} CH₂, CH₃]; 2240 (s) [v CN]; 1460 (m), 1440 (m,sh) [$\delta_{as,s}$ CH₂, δ_{as} CH₃]

15

¹H-NMR (400.132 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 1.35-1.6 (s(b), 1H, NH); 2.13 (s, 6 H, N(CH₃)₂); 2.17, 2.42, 2.62, 2.85 (4 x t, 8H, 4 x CH₂)

20 ¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃ [ppm]):

δ = 18.5, 45.1, 46.4, 58.7 (4 x CH₂); 45.25 (N(CH₃)₂); 118.5 (CN)

Beispiel 5

25

Synthese von *N*⁸-Dimethyl-1,5,8-triazaoctan (#5)

- In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Magnetrührer, Rückflußkühler, Septum und Argonzuleitung werden unter einer Argonatmosphäre 90 ml einer 1M Lösung von
- 30 Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether vorgelegt. Über eine Einwegspritze werden dann 9.93 g (70 mmol) #4 vorsichtig zugetropft, so daß der Ether nur leicht siedet. Die Mischung wird daraufhin noch 5 h unter Rückfluß erhitzt.

Danach werden 15 ml einer 20%igen Natronlauge sehr vorsichtig zugetropft. Die entstehenden Hydroxide fallen dabei als sehr grober Niederschlag an, der sich leicht abdekantieren läßt. Die Hydroxidrückstände werden noch 5 x mit je 40 ml Diethylether aufgekocht. Die vereinigten Etherphasen werden filtriert und das Lösungsmittel daraufhin am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und einmal mit 5 ml 5N NaOH-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die leicht ölige Flüssigkeit im Feinvakuum fraktionierend destilliert. Man erhält 3.96 g (27.3 mmol) = 39% d.Th. einer farblosen Flüssigkeit mit einem Sdp. von 65°C (0.1 mbar).

10

IR (Film, $[\text{cm}^{-1}]$):

$\bar{\nu} = 3600\text{-}3100$ (s,b) [ν N-H]; 2920 (s), 2800 (s), 2750 (s) [$\nu_{\text{as,s}}$ CH_2 , CH_3]; 1445 (s) [$\delta_{\text{as,s}}$ CH_2 , δ_{as} CH_3]

15

Beispiel 6

Synthese von 7-Chlor-4-[N^1 -(N^5 -H)-(N^8 -dimethyl)-1,5,8-triaza-octyl]-chinolin (#6)

- 20 In einem verschlossenen 25 ml Rundkolben werden 812 mg (4.1 mmol) 4,7-Dichlorchinolin und 1.16 mg (12.3 mmol) Phenol in einer Argonschutzgasatmosphäre unter Rühren für eine Stunde auf 125-130°C erhitzt. Die Schmelze wird daraufhin auf ca. 60°C abgekühlt, mit 596 mg (4.1 mmol) N^8 -Dimethyl-1,5,8-triazaoctan (#5) versetzt und für 24 Stunden unter Rühren auf 130°C erhitzt. Nach dieser Zeit läßt man die Mischung erkalten und setzt 20 ml 5 N
- 25 NaOH-Lösung hinzu. Die Lösung wird in einen Scheidetrichter überführt und 2 x mit je 60 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 ml 5 N NaOH-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 1.37 g eines gelbbraunen, zähen Öls. Die Verbindung kann ohne weitere Aufreinigung zur Darstellung von #7 verwendet werden.
- 30 Analytisch reine Substanz wird durch präparative Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 (70-230 mesh) erhalten (Eluent: Stufengradient aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1 (0.1% Triethylamin) auf $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:3 (0.1% Triethylamin)).

17.12.99

12

DC (Kieselgel 60) [CH₂Cl₂/MeOH 3:1 (0.1% Triethylamin)]; R_f=0.07; UV-Detektion
[80% Ethanol (2% Triethylamin)]; R_f=0.11; UV-Detektion

5

Beispiel 7

Synthese von 7-Chlor-4-[N¹-(N⁵-carboxycholesteryl)-(N⁸-dimethyl)-1,5,8-triaza-octyl]-chinolin hydrochlorid (#7)

10. In einem 50 ml Rundkolben mit seitlichem Gaseinlaß werden unter einer Argonatmosphäre 580 mg (1.89 mmol) #6 in 40ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Daraufhin werden unter Kühlung im Eisbad 850 mg (1.89 mmol) Cholesterylchlorformiat zugesetzt. Die Mischung wird für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, woraufhin das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wird. Anschließend säulenchromatographische Aufreinigung
- 15 des Rohproduktes auf Kieselgel 60 (70-230 mesh) mit CH₂Cl₂/MeOH 7:1 als Eluent liefert die reine Verbindung als einen farblosen, amorphen Feststoff.

DC (Kieselgel 60) [CH₂Cl₂/MeOH 7:1]; R_f=0.19; UV-Detektion und Detektion mit Vanilin/konz. Schwefelsäure

20

Beispiel 8

Synthese von 7-Chlor-4-[N¹-(N⁵-(2(R),3-dihydroxy)propyl)-(N⁸-dimethyl)-1,5,8-triaza-
25 octyl]-chinolin (#8)

- In einem verschlossenen 10 ml Rundkolben werden 244 mg (795 µmol) #6 in 2 ml wasserfreiem Methanol gelöst. Die Lösung wird für 72 Stunden bei 0-4°C gerührt, wobei in gleichmäßigen Zeitabständen jeweils Portionen von 10 µl (S)-Glycidol (insgesamt
- 30 100µl=1.51 mmol) zugefügt werden. Daraufhin werden die flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie auf 20 g Kieselgel 60 (70-230mesh) gereinigt.

Als Eluent verwendet man dabei einen Stufengradienten aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1 (0.1% Triethylamin) auf $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 (0.1% Triethylamin). Man erhält 24.5 mg (64 μmol) = 8.1% d.Th. eines farblosen, sehr zähen Öls.

- 5 DC (Kieselgel 60) [80% Ethanol (2% Triethylamin)]; $R_f=0.27$; UV-Detektion

Beispiel 9

- 10 Synthese von 7-Chlor-4-[N^1 -(N^5 -(2(R),3-dioleoyloxy)propyl)-(N^8 -dimethyl)-1,5,8-triazaoctyl]-chinolin (#9)

In einem verschlossenen 10 ml Rundkolben werden 24.5 mg (64 μmol) #8 in 1.5 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Daraufhin werden 36 μl (256 μmol) Triethylamin, 41 μl (128 μmol) Ölsäure und 34 mg (131 μmol) N,N -Bis-[2-oxo-3-oxazolidinyl]-phosphorsäurediamidchlorid (BOP-Cl) zugefügt. Die Mischung wird für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Umsatz mittels Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan/Methanol 7:1) verfolgt wird. Nach dieser Zeit wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie auf 20 g Kieselgel 60 (70-230 mesh) gereinigt. Als Eluent dient dabei Dichlormethan/Methanol 7:1. Man erhält 24 mg (26 μmol) = 41% d.Th. eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

DC (Kieselgel 60) [Dichlormethan/Methanol 7:1]; $R_f=0.30$; UV-Detektion und Detektion mit Vanilin/konz. Schwefelsäure

25

Beispiel 10

Formulierung der erfindungsgemäßen amphiphilen Polyamine für die
30 Transfektionsexperimente

a) Liposomale Formulierung

Lösungen der Amphiphile #2, #3, #7, #9 in Chloroform werden mit einer Lösung von 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) in Chlorform in unterschiedlichen molprozentualen Verhältnissen gemischt und im Vakuum zu einem Lipidfilm eingetrocknet.

- 5 Letzte Lösungsmittelreste werden dabei im Hochvakuum entfernt. Daraufhin werden die Lipidfilme in sterilem Wasser rehydratisiert und durch Ultraschallbehandlung die Liposomen generiert. Die Gesamt-Lipidkonzentration der resultierenden Dispersion beträgt dabei 1mg/ml.

10 b) Ethanolische Formulierung

Die kationischen Lipide werden in unterschiedlichen molprozentualen Verhältnissen mit DOPE gemischt und in wasserfreiem Ethanol gelöst. Die Gesamt-Lipidkonzentration der resultierenden Lösung beträgt 1mg/ml.

15

Beispiel 11

Transfektion von adhärenen Zelllinien

- 20 Allgemeines: Verwendete Zelllinien HeLa, Hec1a, SKOV3, MCF-7, Hey, SKBR3, T47D, 293 werden unter Standardbedingungen (gemäß ATCC-Angaben) kultiviert. Die kommerziellen Transfektionreagenzien Transfectam[®], Lipofectamine[™] und Superfect wurden gemäß der Herstellerangaben verwendet. DC-Chol wurde entsprechend der Literaturvorschrift [L. Huang et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. **179**(1) (1991) 280-
25 285] synthetisiert, mit DOPE formuliert und zur Transfektion eingesetzt.

a) Transfektion mit pEGFP-N1 -Plasmid

a.1) Verwendung der Reagenzien als wäßrige Liposomen-Dispersion

- 30 Am Tag vor der Transfektion werden pro well einer 24-well-Zellkulturplatte 40-50000 Zellen (ca. 70% Konfluenz) ausgesät. Zur Transfektion werden 2 µg des Plasmids (pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc; Katalog-Nr. 6085-1) in 300µl FCS-freiem Medium vorgelegt, mit 3 µl (SKBR3, MCF-7, Hey) bzw. 6 µl (HeLa, Hec1a, SKOV3) des wäßrigen Lipidreagenzes

(30 mol% Lipid #2 bzw. #7 bzw. #9; 70 mol% DOPE) versetzt und die Mischung für 30min bei RT inkubiert. Kurz vor der Transfektion wird das Medium entfernt und durch 700µl frisches Medium (14,3% FCS) ersetzt. Nach Zugabe des Lipid-DNA-Komplexes wird für 48 Stunden inkubiert und daraufhin der Anteil der GFP-exprimierenden, fluoreszierenden Zellen durch FACS-Analyse bestimmt. Hierzu werden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Die Zellen werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Daraufhin wird das Zellpellet in 500µl PBS aufgenommen und der Anteil fluoreszenter Zellen an einem FACS-Gerät (Becton Dickinson, FACScan) bestimmt.

10 a.2) Verwendung der Lipide in ethanolischer Lösung

Am Tag vor der Transfektion werden pro well einer 24-well-Zellkulturplatte 40-50000 Zellen (ca. 70% Konfluenz) ausgesät. Zur Transfektion werden 2 µg des Plasmids (pEGFP-N1; Clontech Laboratories, Inc; Katalog-Nr. 6085-1) in 300µl FCS-freiem Medium vorgelegt, mit 4 µl des ethanolischen Lipidreagenzes (30 mol% Lipid #2 bzw. #7; 70 mol% DOPE) versetzt und die Mischung für 30min bei RT inkubiert. Bei der Transfektion in Gegenwart von Protaminsulfat werden 2 µg des Plasmids in 300 µl FCS-freiem Medium vorgelegt und mit 2 µg Protaminsulfat komplexiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min werden 4 µl des Lipidreagenzes zugesetzt. Kurz vor der Transfektion wird das Medium entfernt und durch 700µl frisches Medium (14,3% FCS) ersetzt. Nach Zugabe des Lipid-DNA-Komplexes wird für 48 Stunden inkubiert und daraufhin der Anteil der GFP-exprimierenden, fluoreszierenden Zellen durch FACS-Analyse, wie unter a.1 beschrieben, bestimmt.

b) Transfektion mit pRc/CMVlacZ-Plasmid

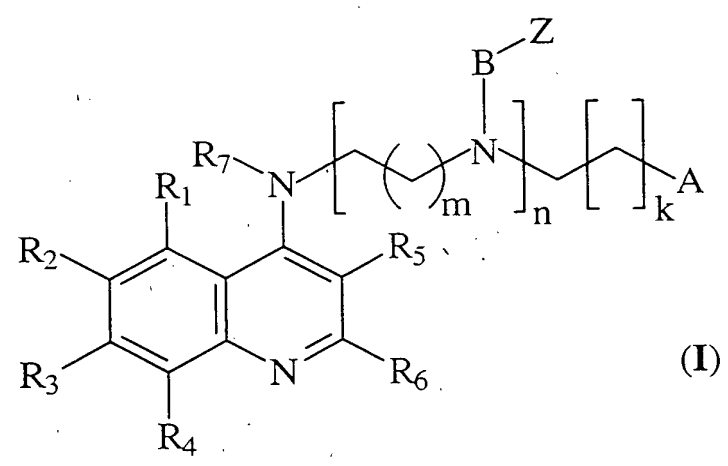
25 pRc/CMVlacZ-Plasmid: lacZ wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme HindIII und XbaI aus dem kommerziell verfügbaren Vektor pSVbetaGal (Promega; Kat.-Nr. E1081) herausgeschnitten und in das Expressionsplasmid pRc/CMV (Invitrogen; HindIII und XbaI geschnitten) einkloniert.

Am Tag vor der Transfektion werden 12-15000 Zellen pro well einer 96-well-Zellkulturplatte
30 ausgesät. Kurz vor der Transfektion wird das Medium durch 80µl/well frisches Medium (20% FCS) ersetzt. Zur Untersuchung der Inhibition der Transfektionseffizienz durch FCS (Abb. 8) wird Medium mit einem Anteil von 20-100% FCS vorgelegt.

Daraufhin werden 80 μ l des Lipid-DNA-Komplexes, hergestellt aus 0,5-1 μ g DNA in 40 μ l FCS-freiem Medium und 0,5-2 μ l der wässrigen Lipiddispersion (20-60mol% Lipid #2 oder #7; 80-40mol% DOPE) in 40 μ l FCS-freiem Medium, hinzupipettiert und die Zellen für 48 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert. DC-Chol wird entsprechend den in der Literatur (s.o.)
5 beschriebenen Bedingungen verwendet.

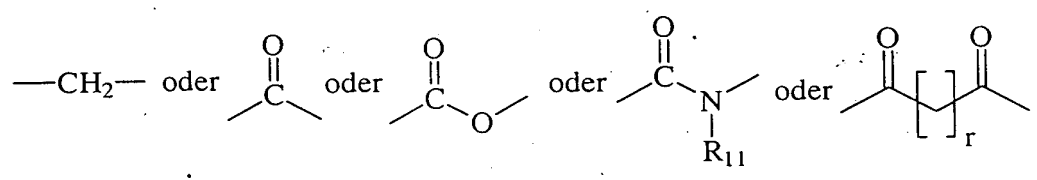
Die gleichzeitige Bestimmung der Reporter-Gen-Expression und der Zellvitalität erfolgt nach einem literaturbekannten Verfahren [D. Groth, O. Keil et al.; Anal. Biochem. **258** (1998) 141-143] und liefert die Gesamt-beta-Galactosidase Expression in mU/well und die Zellvitalität in Prozent relativ zu unbehandelten Zellen.

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I



wobei

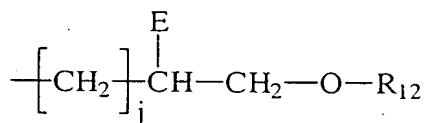
- 5 R_1 bis R_6 unabhängig voneinander einen Rest Wasserstoff, Halogen, $-C\equiv N$, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-COOH$, $-N(Alkyl)_2$, $-NH(Alkyl)$, $-NH_2$, $-Alkyl$, $-OH$, $-O-Alkyl$, $-O-Aryl$, $-O-Hetaryl$, $-O(C=O)Alkyl$, $-(C=O)Alkyl$, $-SH$, $-S-Alkyl$ bedeuten,
- R_7 einen Rest Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen bedeutet,
- m und k unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 1 bis 6 sind,
- 10 n eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist,
- A eine Gruppe $N^+R_8R_9R_{10}Y^-$ bedeutet, wobei R_8 bis R_{10} unabhängig voneinander einen Rest Wasserstoff, eine Alkyl-Gruppe mit 1 bis 4 C-Atomen, eine Gruppe $-(CH_2)_i-OH$ oder eine Gruppe $-(CH_2)_i-NH_2$ mit $i=2-6$ bedeuten und Y^- ein pharmazeutisch akzeptables Anion darstellt,
- 15 B eine Gruppe



bedeutet, in der R_{11} die für R_7 angegebene Bedeutung hat und r eine ganze Zahl von 1 bis 6 sein kann,

Z ein über das C-Atom 3 (des Steran-Grundgerüsts) gebundenes Steroid, einen Rest R_{12}

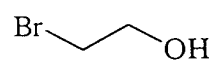
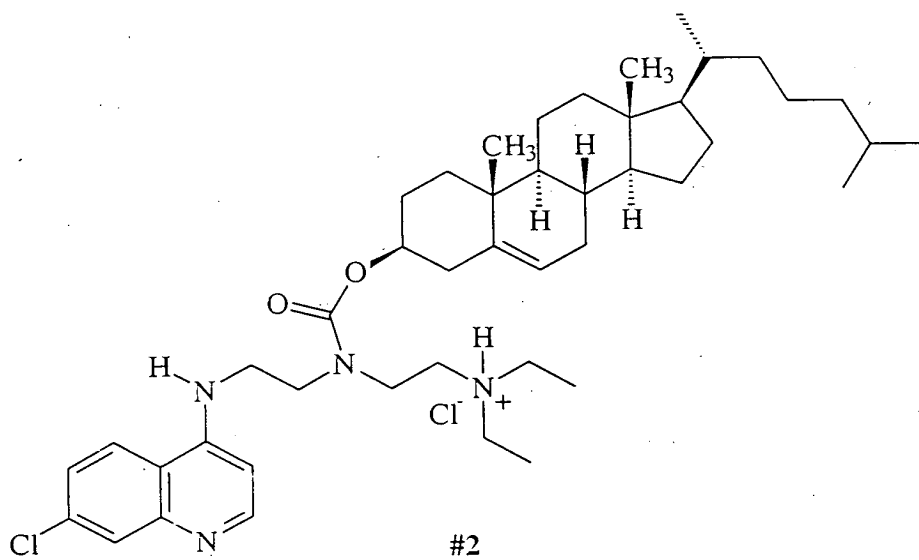
- 20 oder eine Gruppe



- bedeutet, wobei j eine ganze Zahl von 0 bis 4 sein kann, R₁₂ einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl oder Acylrest mit 8 bis 24 C-Atomen darstellt und E eine Gruppe O-R₁₃ oder CH₂-O-R₁₃ bedeutet, bei der R₁₃ die für R₁₂ angegebene Bedeutung hat und gleich
- 5 oder von R₁₂ verschieden sein kann,
- und wobei das Stickstoff-Atom des Chinolin-Gerüsts zusätzlich von einer Säure H⁺Y⁻ protoniert sein kann, wobei Y⁻ ein pharmazeutisch akzeptables Anion darstellt.
2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Reste R₁, R₂, R₄, R₆ und R₇ ein Wasserstoffatom darstellen, R₅ ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 1 bis 4
- 10 C-Atomen ist und R₃ ein Halogenatom bedeutet.
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß m und k gleich 1 bis 3 sind, n gleich 1 ist und A eine Dimethylammonium- oder Diethylammonium-Gruppe bedeutet.
4. Verbindungen nach Anspruch 1,2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, daß B eine Gruppe
- 15 -CH₂- oder -C(O)O- repräsentiert und Z einen Cholesterylrest oder einen 1,2-Dioleoyloxyethylrest darstellt.
5. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Y⁻ ein Halogenid-, Acetat- oder Phosphat-Anion darstellt.
6. Reagenz, bestehend aus mindestens einer Verbindung der Ansprüche 1 bis 5, dadurch
- 20 gekennzeichnet, daß zusätzlich andere lipidische Verbindungen in unterschiedlichen Anteilen beigemischt sein können und daß die Verbindung/en in wäßrigen Medien dispergiert, oder in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel gelöst vorliegen, wobei im Falle einer wäßrigen Dispersion gleichzeitig Kryo-Schutzmittel aus der Gruppe Lactose, Trehalose, Sucrose, Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Mannitol oder Polyethylenglykol gelöst sein können.
- 25 7. Reagenz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzlich beigemischten lipidischen Verbindungen der Phospholipid- oder Steroidklasse angehören und es sich bei dem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel um Ethanol handelt.
8. Reagenz für pharmazeutische oder diagnostische Anwendungen, dadurch gekennzeichnet, daß aus biologisch aktiven, anionischen Makromolekülen und einem Reagenz nach Anspruch
- 30 6 oder Anspruch 7 ein Aggregat gebildet wird, welches in wäßriger Dispersion vorliegen kann oder in ein Lyophilisat überführt wird.

9. Reagenz für pharmazeutische oder diagnostische Anwendungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den biologisch aktiven, anionischen Makromolekülen um DNA, RNA, Antisense-DNA, Antisense-RNA, Ribozymen, Peptiden oder Proteinen handelt.
10. Reagenz für pharmazeutische oder diagnostische Anwendungen nach Anspruch 8 oder
- 5 Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktiven, anionischen Makromoleküle vor der Zugabe der Lipide mit polykationischen Molekülen vorkomplexiert sein können.
11. Reagenz für pharmazeutische oder diagnostische Anwendungen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den polykationischen Molekülen um eine
- 10 Verbindung aus der Gruppe Spermin, Spermidin, Histon H1, Histon H2A, Histon H2B, Histon H3, Histon H4, Protaminsulfat oder HMG-1-Protein handelt.
12. Verfahren für den Transfer von biologisch aktiven, anionischen Makromolekülen in eukaryotische Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Reagenz der Ansprüche 8 bis 11 in vivo oder in vitro mit den Zellen in Kontakt gebracht wird.

Abb. 2



K₂CO₃, Dimethylformamid
24 h, 60°C

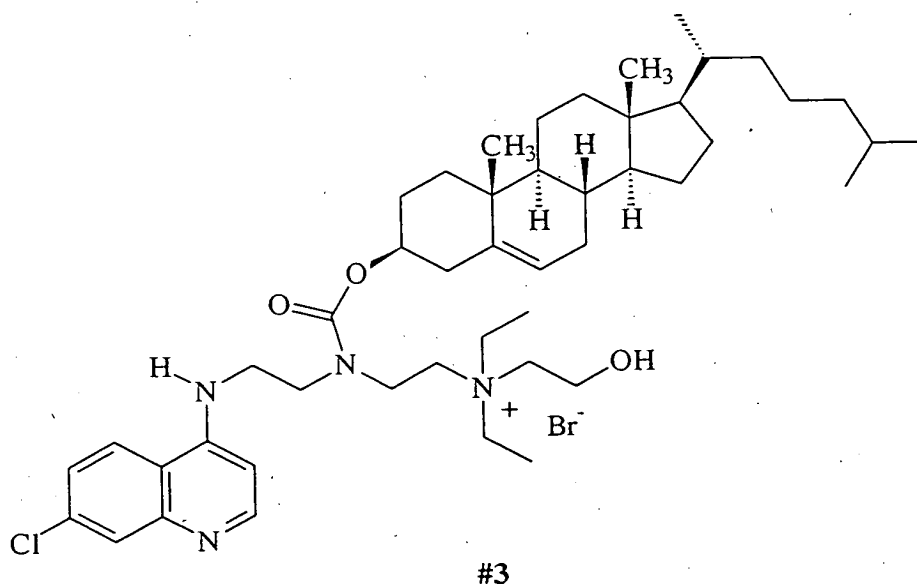


Abb.3

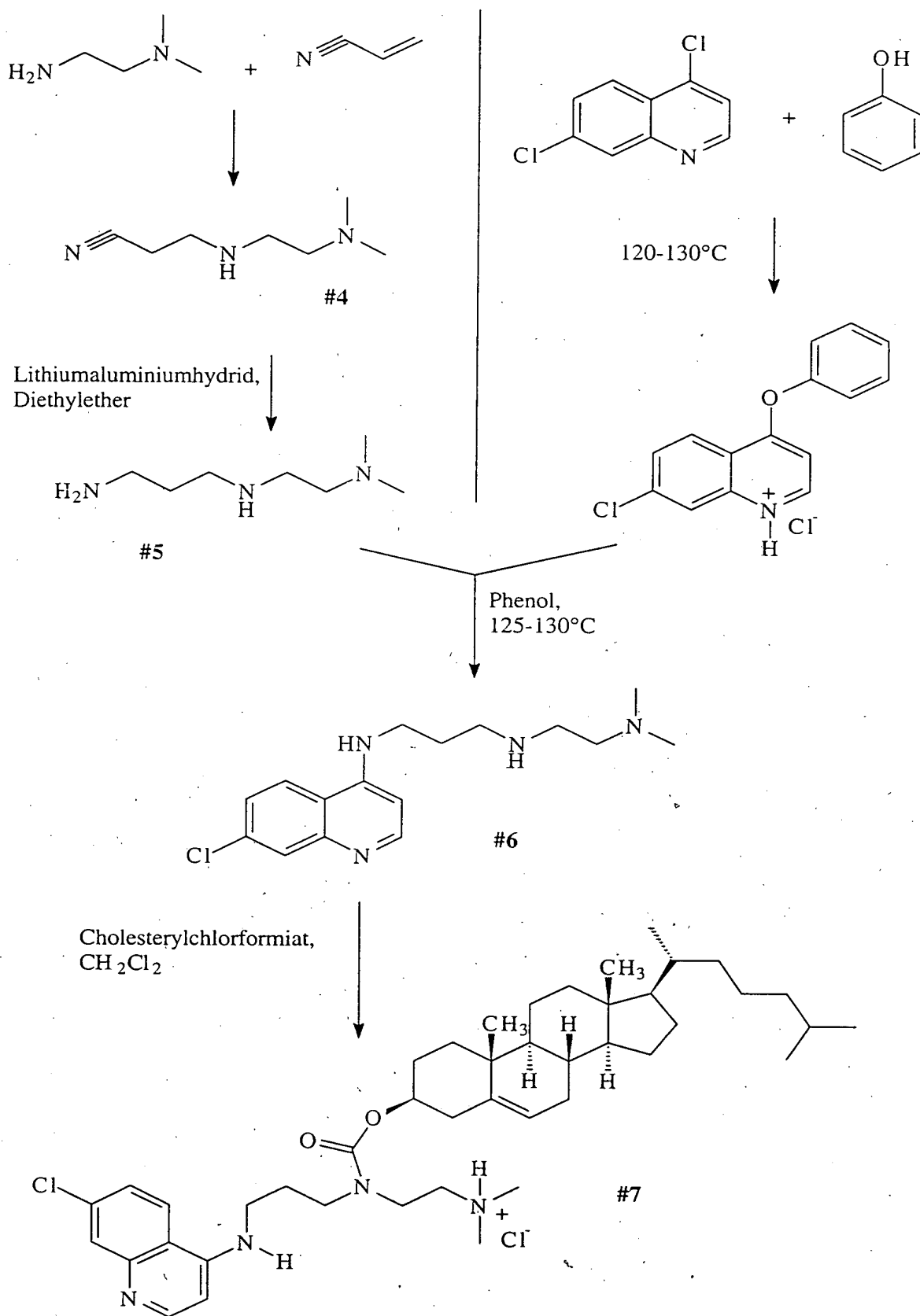
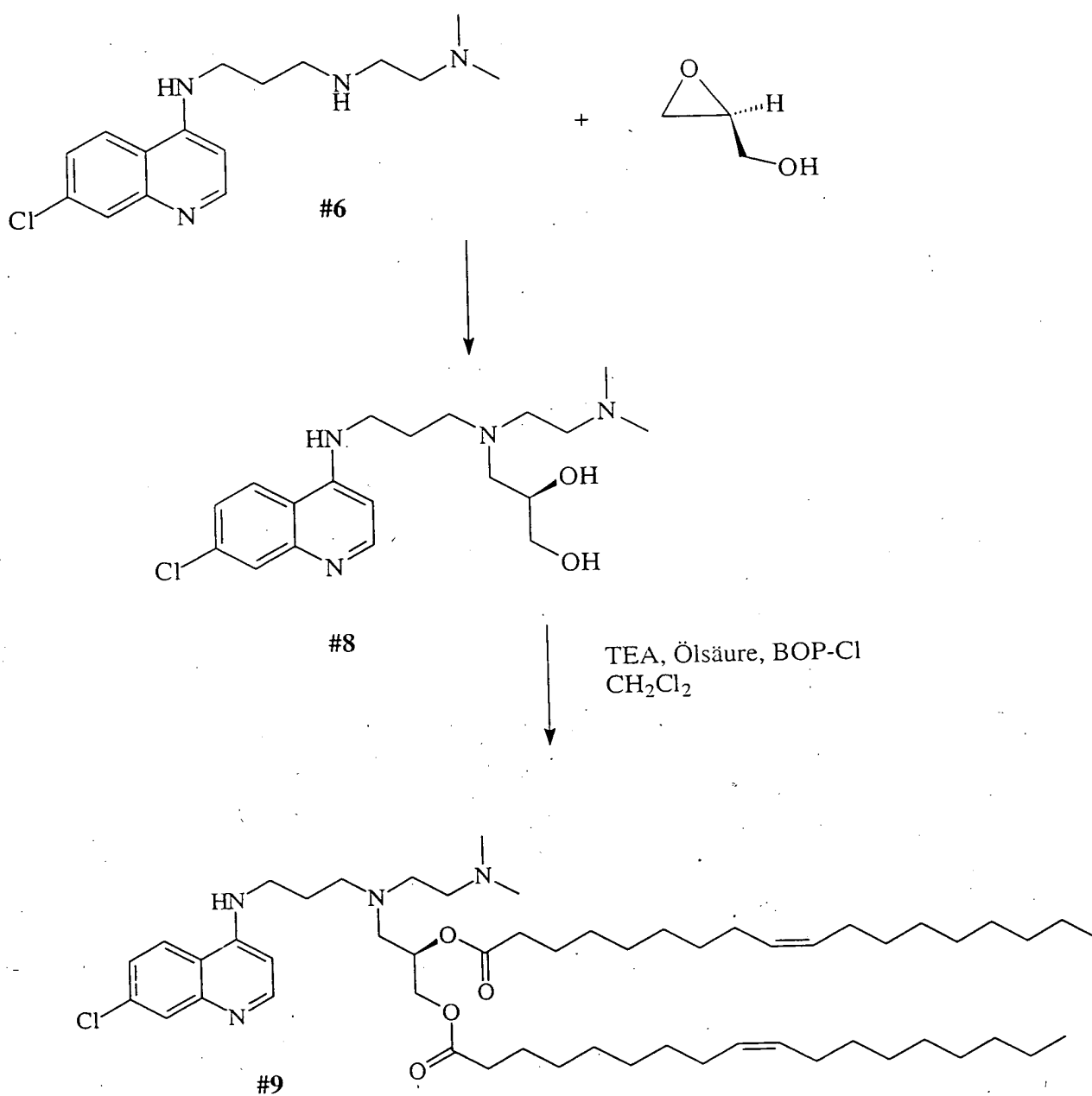
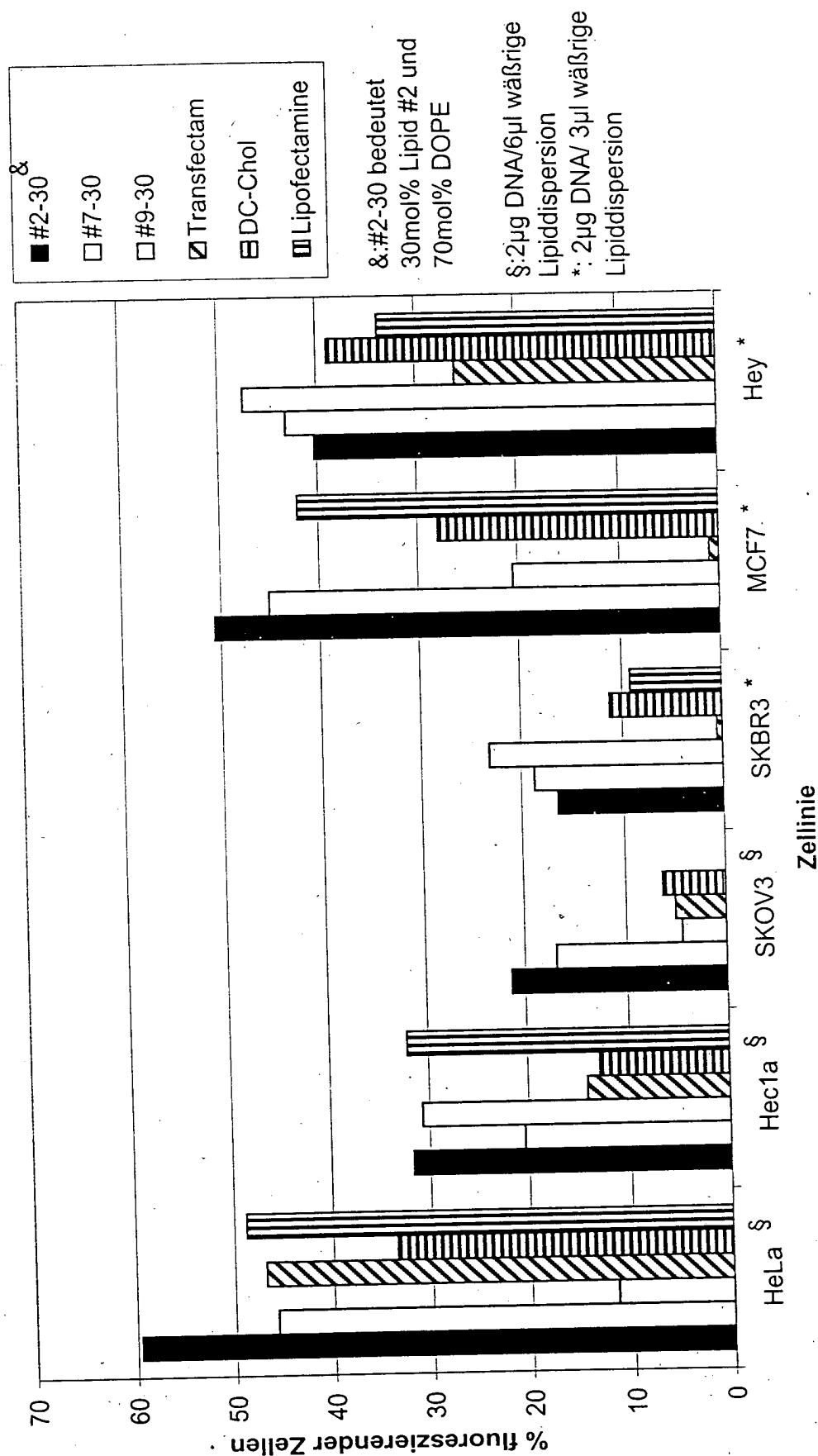


Abb. 4



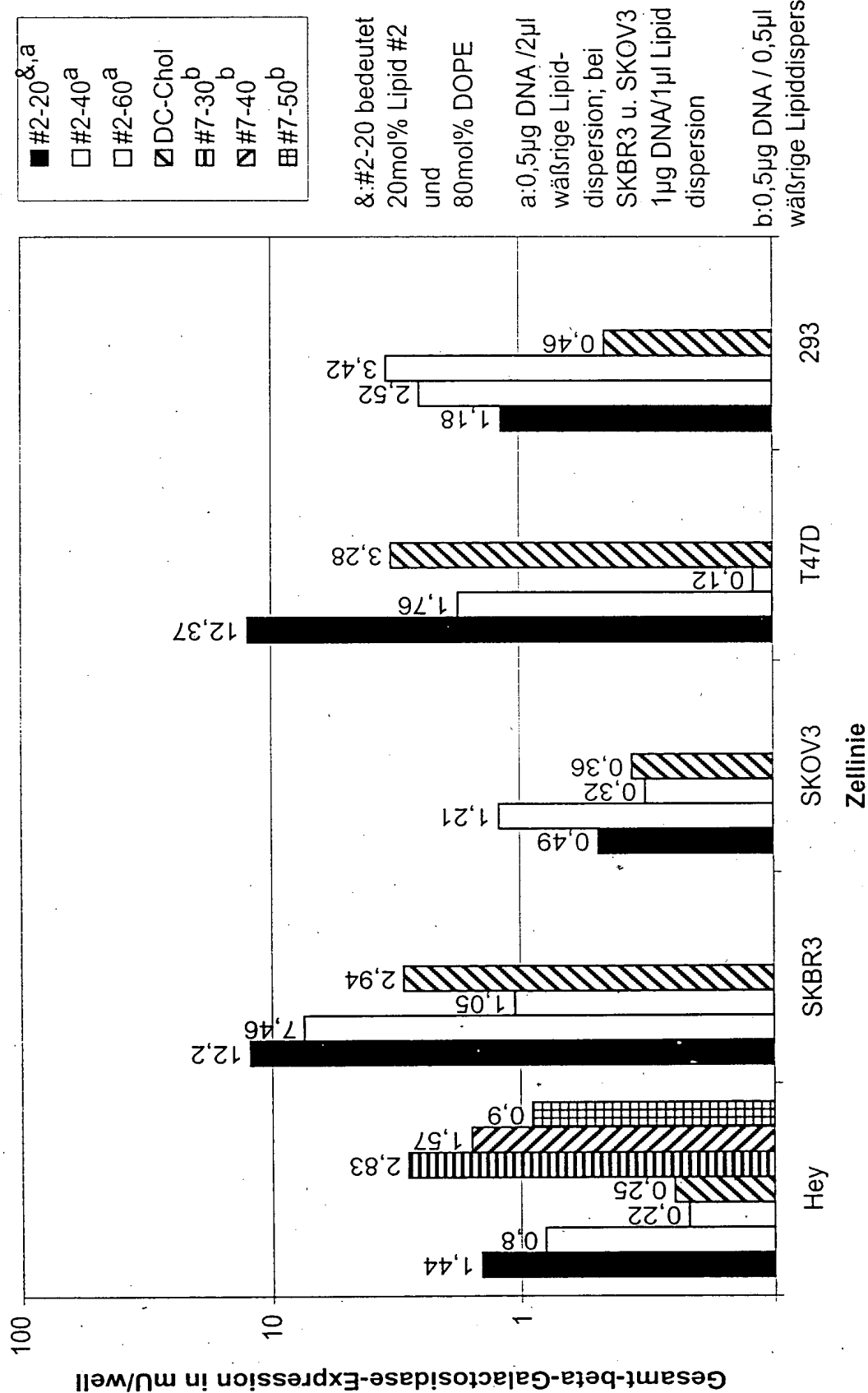
Transfektion von Tumorzelllinien mit pEGFP-N1-Plasmid

Abb. 5



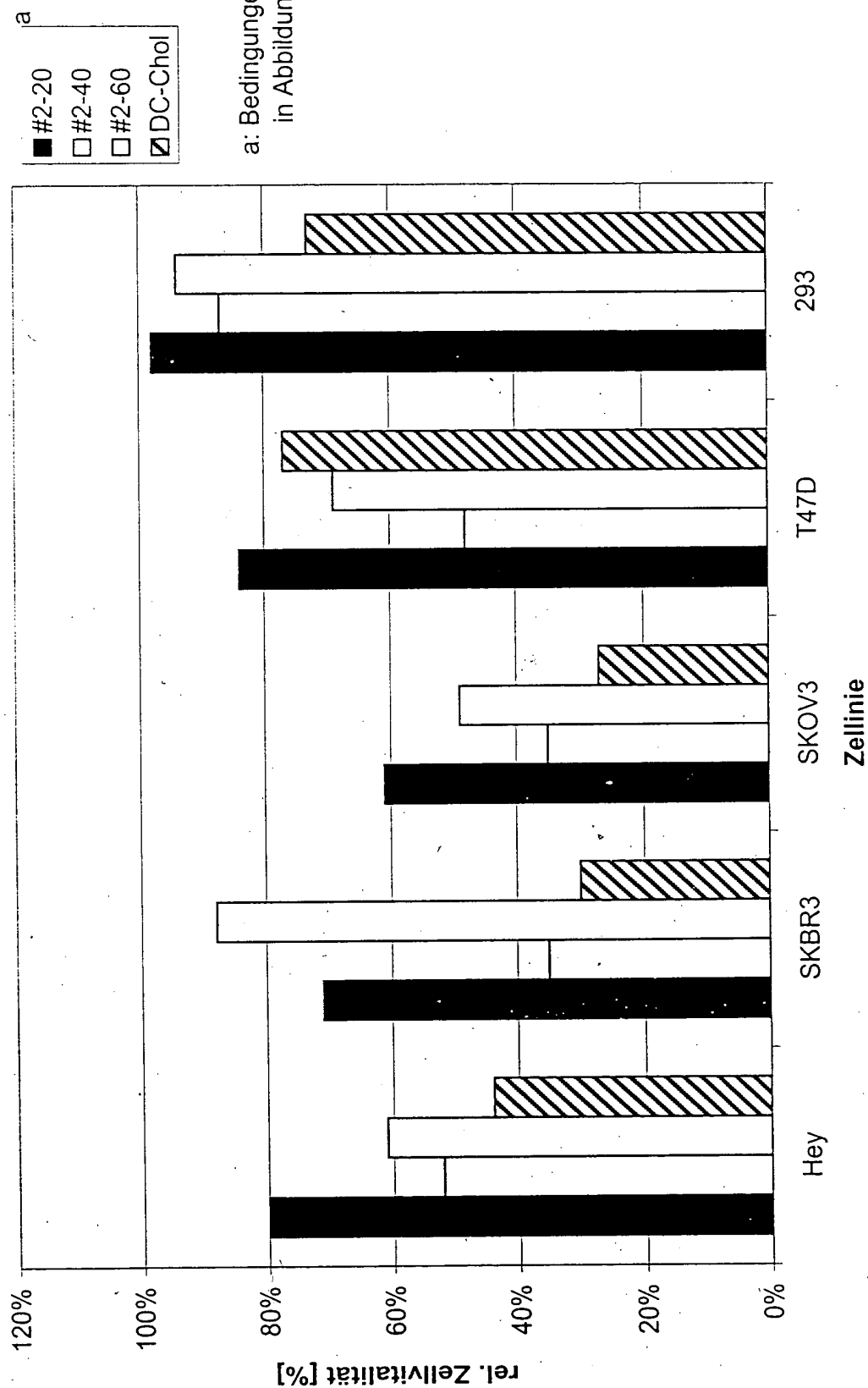
Transfektion von Tumorzelllinien mit pRc/CMVbetaGal-Plasmid

Abb. 6



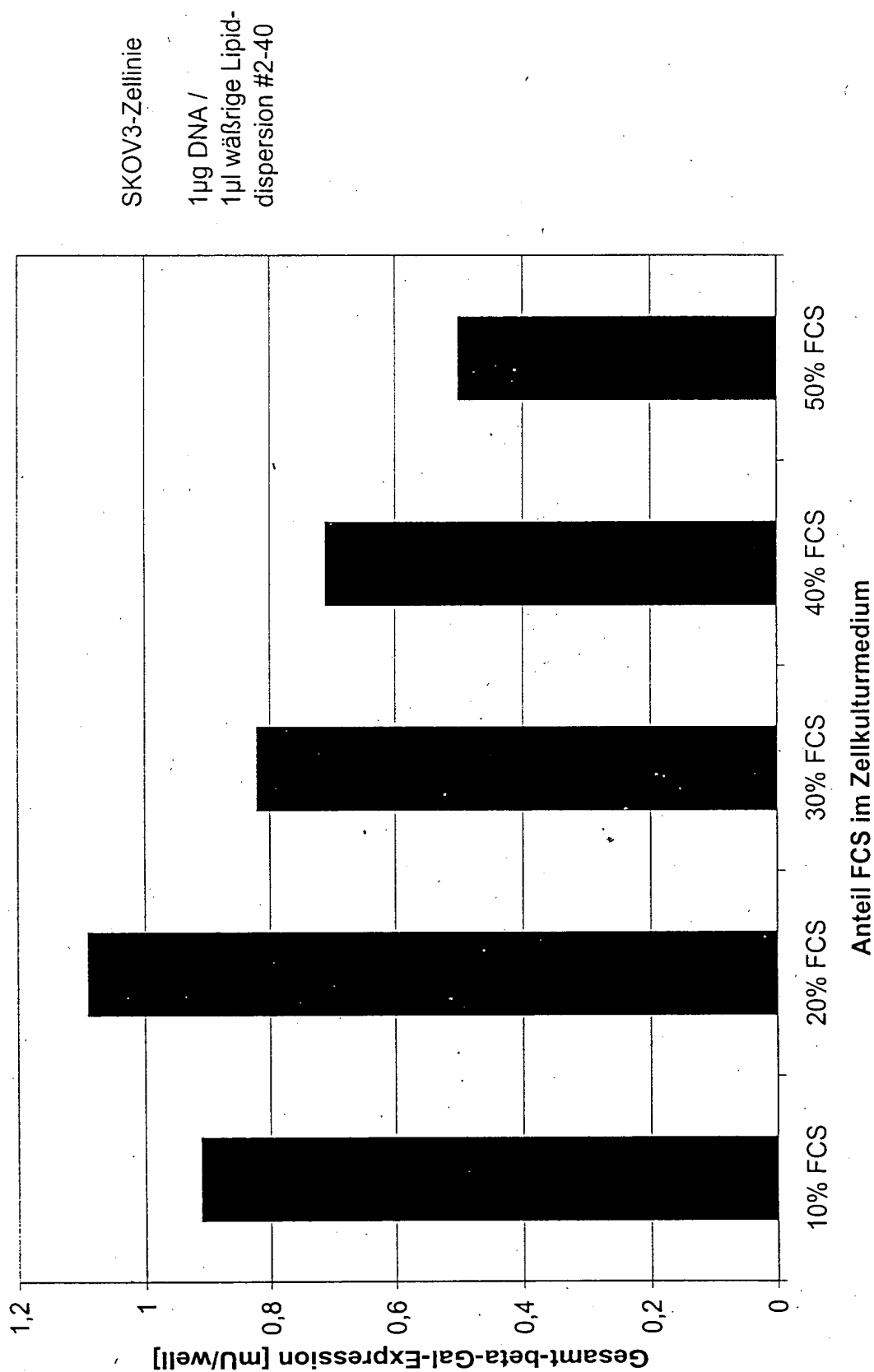
rel. Zellvitalität nach Transfektion mit pRc/CMVbeta-Gal-Plasmid
(unbehandelte Zellen = 100%)

Abb. 7



Einfluß von Serum auf die Transfektionseffizienz

Abb. 8



17.10.98

Transfektion von MCF7 Zellen mit Lipiden #2, #7 in ethanolischer Lösung unter Zusatz von Protaminsulfat und unter Verwendung von pEGFP-N1-Plasmid

Abb. 9

